

15.06.00

Priority 2
~~PCT/NL 00/00331~~

*(June Priority
DOC)*

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

NL 00/331

Bureau voor de Industriële Eigendom

COPY



4

REC'D 28 JUN 2000

WIPO PCT

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 30 juni 1999 onder nummer 1012481,
ten name van:

**HET NEDERLANDS KANKERINSTITUUT ANTONI VAN LEEUWENHOEK
ZIEKENHUIS**

te Amsterdam

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Werkwijze voor het verbeteren van de biologische beschikbaarheid van medicijnen die oraal
worden toegediend, werkwijze voor het screenen op verbeteraars van de biologische
beschikbaarheid en nieuwe farmaceutische samenstellingen voor orale afgifte van medicijnen",
en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 15 juni 2000.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

A.W. van der Kruk.

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17 I(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

B. V. (I. E.)
20 SEP 1999

Uittreksel

De onderhavige uitvinding is gericht op een werkwijze voor het verbeteren van de biologische beschikbaarheid van medicijnen die oraal worden toegediend. Voorts
5 behelst de uitvinding een werkwijze voor het screenen op verbeteraars van de biologische beschikbaarheid van medicijnen die oraal worden toegediend. Eveneens behelst de uitvinding het toepassen in farmaceutische samenstellingen van de verbeteraars van de biologische beschikbaarheid voor het oraal afleveren van medicijnen, waardoor in nieuwe en verbeterde farmaceutische samenstellingen wordt
10 voorzien.

**Werkwijze voor het verbeteren van de biologische beschikbaarheid van
medicijnen die oraal worden toegediend, werkwijze voor het screenen op
verbeteraars van de biologische beschikbaarheid en nieuwe farmaceutische
samenstellingen voor orale afgifte van medicijnen**

5

Samenvatting van de uitvinding

De onderhavige uitvinding is gericht op een werkwijze voor het verbeteren van de biologische beschikbaarheid van medicijnen die oraal worden toegediend. Voorts behelst de uitvinding een werkwijze voor het screenen op verbeteraars van de biologische beschikbaarheid van medicijnen die oraal worden toegediend. Eveneens behelst de uitvinding het toepassen in farmaceutische samenstellingen van de verbeteraars van de biologische beschikbaarheid voor het oraal afleveren van medicijnen, waardoor in nieuwe en verbeterde farmaceutische samenstellingen wordt voorzien.

15

Achtergrond van de uitvinding

De biologische beschikbaarheid van medicijnen is een complexe zaak. Aangaande de biologische beschikbaarheid van medicijnen is lange tijd de aandacht gericht geweest op processen die in de lever afspelen. Al het bloed uit het spijsverteringskanaal passeert de lever voordat het naar ergens anders in het lichaam gaat. Men dacht dus dat het effect van eerste passage door de lever van grote invloed was op de biologische beschikbaarheid. In ieder geval dacht men dat voor een meerderheid aan verbindingen dit van grotere invloed was dan welk mechanisme dan ook dat door de darmen wordt uitgeoefend. Men dacht dat dit het geval was bijvoorbeeld als gevolg van het in veel mindere mate aanwezig zijn van cytochroom P450 in de darmen vergeleken met de lever. Het was bekend dat cytochroom P450 biotransformatiefase I katalyseert, d.w.z. het proces dat betrokken is bij het verwijderen van medicijnen uit het lichaam. In fase II, de volgende stap in het verwijderingsproces, wordt een hydrofiele groep toegevoegd om de oplosbaarheid te verhogen en dus vervolgens de verwijdering door de nieren of de gal te versnellen.

Bij beschouwing van het probleem van de biologische beschikbaarheid van medicijnen zijn van oudsher de inspanningen dus gericht geweest op het verhogen van oplosbaarheid en permeabiliteit van membranen als men. In het bijzonder zijn

biotransformatieproces in de lever. Echter, het probleem met deze benaderingen is het brede scala aan effecten geweest dat deze hebben op metabolisme in de lever in het algemeen en derhalve het brede scala aan niet specifieke en vaak dus ongewenste systemische effecten.

5 Onlangs echter is gesuggereerd dat de absorptie over darmepitheel ook de biologische beschikbaarheid van medicijnen beïnvloedt. Het enterocytmembraan bevat talrijke transporteiwitten die voedingsstoffen van het lumen van de darm in de enterocyten brengen. Passage van veel moleculen door het membraan naar het cytoplasma gebeurt door actief of passief transport. De voedingsstoffen, en ook
10 medicijnen, gaan vervolgens door de enterocyten naar het capillaire net en gaan zo verder naar het circulatiesysteem en de lever.

Echter, darmen kunnen ook verbindingen verwijderen uit het cytoplasma van enterocyten en deze terug naar het lumen transporteren. Dit is waarschijnlijk een mechanisme dat is ontstaan om te beschermen tegen mogelijk schadelijke verbindingen
15 die het lichaam via de orale route binnenkomen. Volgens deze argumentatie suggereert US-5.567.592 dat twee aan de darm gerelateerde mechanismen geremd konden worden om de netto stroom medicijnen uit de darmen te verhogen. Enerzijds wordt een cytochroom P450 remmer gesuggereerd en anderzijds wordt de toepassing van een remmer van P-glycoproteïne (P-gp) gesuggereerd of een combinatie van de twee
20 categorieën remmers.

Als gevolg van het feit dat het netto transport van medicijnen door de enterocytenlaag verhoogd zal zijn kan, met de bedoeling de biologische beschikbaarheid van medicijnen te verhogen, de terug-transportactiviteit van P-glycoproteïne in de darmen van een zoogdier worden geremd. P-glycoproteïne (P-gp) bevindt zich onder
25 andere in de dunne darm en colon op epitheelcellen aan de kant van het lumen en transporteert toxinen uit de voeding terug naar het lumen en helpt derhalve te voorkomen dat toxinen opgenomen worden in de portale circulatie. Het document geeft echter niet een illustratie of een specifiek voorbeeld van een P-gp-remmer en levert geen informatie over het succes van de gekozen werkwijze. Het document toont slechts
30 een toename van de biologische beschikbaarheid van cyclosporine veroorzaakt door het tegelijkertijd toedienen van ketoconazol. Ketoconazol is een cytochroom P450 remmer.

Een later document (The Lancet, Vol. 352, 25 juli 1998) beschrijft hoe het tegelijkertijd toedienen van cyclosporine aan patiënten orale therapie met paclitaxel mogelijk maakt. Gewoonlijk is oraal toegediend paclitaxel slecht biologisch beschikbaar als gevolg van de buitengewoon hoge affiniteit daarvan voor het

5 transporteiwit P-glycoproteïne dat overvloedig aanwezig is in het spijsverteringskanaal (Trends Genet. 1997; 13:217-22, Cell 1994; 77: 491-502). Onderzoek in *mdr1a* (-/-) knockout-muizen die geen P-gp hebben toonde toegenomen opname van paclitaxel aan (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997; 4:2031-35). Vervolgens werd beschreven (British Journal of Cancer 1997; 76:1181-1183) hoe paclitaxel oraal werd toegediend aan wild-

10 type-muizen samen met het P-gp blokkerende SDZ PSC 833 of het P-gp blokkerende cyclosporine (Clinical Cancer Research 1998; 4:2293-2297) wat resulteerde in een tienvoudig toegenomen systemische blootstelling aan paclitaxel. Vervolgens werden tests op patiënten uitgevoerd uitgevoerd om dit concept te bewijzen (The Lancet, Vol. 352, 25 juli 1998) en deze bevestigden de resultaten. Het tegelijkertijd toedienen van

15 paclitaxel en cyclosporine verhoogde de absorptie van oraal paclitaxel naar therapeutische concentraties in het plasma.

Bekend is dat P-gp in verband wordt gebracht met het ontwikkelen van weerstand tegen medicijnen ("multidrug resistance"; MDR) van tumorcellen. Een aantal andere transporteiwitten zijn ook in verband gebracht met weerstand tegen medicijnen) zoals

20 het MRP (multidrug resistance associated protein) en mogelijk het MVP (major vault protein). Een alternatief systeem dat ook tot MDR leidt is de verstoring door sommige medicijnen van de eigenschap van de cel om in apoptose te gaan, bijvoorbeeld cellen die genetisch deficiënt zijn voor p53 of cellen die *bcl1L* tot overexpressie brengen. Zowel MRP als P-gp behoren tot de groep eiwitten die aangeduid wordt als ABC-

25 eiwitten. ABC-eiwitten werken gewoonlijk als ATP-bindende eiwitten. Het fenomeen "multidrug" weerstand (MDR) behelst tumorcellen die weerstand vertonen tegen een groot aantal structureel verschillende antineoplasma middelen. De middelen omvatten antracyclinen, vinca-alkaloiden, taxol en epipodofylotoxinen. Voor transport van hydrofobe verbindingen uit een tumorcel is hydrolyse van ATP nodig aan de kant van

30 het cytoplasma van P-gp nodig. MDR behorend bij P-gp kan mogelijk omgekeerd worden door het toedienen van verapamil, diltiazem, chinine, trifluorperazine of cyclosporine.

Opgemerkt dient te worden dat ondanks uitgebreide kennis van deze MDR-mechanismen bij in vitro systemen nog steeds onduidelijk is voor veel tumoren welke mechanismen het meest aan de "multidrug" weerstand in de klinische omgeving bijdragen. Het is zeer goed mogelijk dat andere niet-geïdentificeerde of niet goed begrepen MDR-mechanismen ten minste net zo belangrijk als de hierboven gedefinieerde MDR-mechanismen blijken te zijn.

In verband hiermee wijzen wij op een nieuw gevonden eiwit. Het eiwit wordt "Breast Cancer Resistance Protein" of BCRP genoemd. Het is eveneens bekend als MXR of ABCP. Een aantal recente publicaties heeft aangetoond dat dit eiwit ook in verband staat met weerstand tegen medicijnen. Een aantal van die publicaties staan in Proceedings of the American Association for Cancer Research volume 40, maart 1999, e.g. Rocchi et al. Abstract 2090, Zhan et al. Abstract 2091, Ross et al. Abstract 2092, Rabindran et al. Abstract 2093, Litman et al. Abstract 4413, Schlegel et al. Abstract 4415 en Rohde et al. Abstract 4417.

De aminozuurvolgorde van BCRP is bepaald, het gen is geïsoleerd en de volgorde van het gen is bepaald (Doyle et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1998 Vol 95; 15665-15670). Vastgesteld is dat het een ABC-transporteiwit is. Het P-gp-eiwit is ook een ABC-eiwit, maar verschilt significant van het BCRP. Dit komt duidelijk naar voren uit de gegevens van de volgorde en ook door het feit dat de aanwezigheid van verpamil (een remmer van P-gp) de weerstand tegen het medicijn doxorubicine niet ophief in cellen die BCRP tot overexpressie brengen. De weerstand tegen doxorubicine werd vervolgens toegeschreven aan overexpressie van dit eiwit. Derhalve kunnen cellen die weerstand tegen doxorubicine hebben P-gp en/of BCRP transportmechanismen hebben. Anderzijds vertonen cellen die P-gp tot overexpressie brengen ook weerstand tegen paclitaxel of vincristine. Er is echter geen weerstand tegen deze verbindingen aanwezig als het P-gp-mechanisme inactief is en het BCRP-mechanisme actief is. Dus er zijn duidelijk twee verschillende medicijnweerstandssystemen met verschillende eiwitten, die verschillende specificiteit voor medicijnen tonen.

Ondanks het gebrek aan gegevens betreffende het transportmechanisme van BCRP werd besloten om te onderzoeken of dit een nuttig doel om te benaderen zou zijn gelet op het vergroten van orale biologische beschikbaarheid van medicijnen. Een redenering analoog aan die toegepast voor P-gp werd gevolgd, echter zonder enige gedetailleerde kennis van het mechanisme dat geremd moet worden en de mogelijke

gevolgen daarvan voor de cel of, belangrijker, voor de patiënt. Voorts was er geen kennis of het effect sterk genoeg zou zijn om enig effect op de verspreiding van medicijnen te laten zien. Ook was er geen kennis of er remming van een dergelijk transportsysteem tot activatie van een ander systeem zou leiden. Ook was er geen
 5 indicatie of de remming meer schadelijk dan voordelig zou zijn. Als gevolg van de grote verschillen tussen P-gp en BCRP en gebrek aan kennis over het transportmechanisme, was er geen redelijke kans van slagen dat het BCRP-systeem analoog aan dat van P-gp zou kunnen werken en dat remming daarvan derhalve de orale medicijnafgifte zou kunnen verhogen zonder de normale celprocessen mogelijk
 10 ernstig te verstoren en derhalve mogelijk schadelijk voor de patiënt zou zijn.

Beschrijving van de uitvinding

In vitro onderzoek heeft aangetoond dat cellen die BCRP tot overexpressie brengen resistent zijn tegen een groot en gevarieerd aantal verbindingen. Voorbeelden
 15 daarvan zijn camptothecine en derivaten daarvan in het bijzonder topotecan, SN38 (een actief metaboliet van CPT11, ook bekend als irinotecan), GG221 (GF147211), ook bekend als NX211), DX8951f, BNP1350, 9-aminocamptothecine, 9-nitrocamptothecine en mitoxantron.

We hebben vervolgens een aantal verbindingen hieruit geselecteerd en getest die
 20 eveneens een lage biologische beschikbaarheid vertonen om te kijken of we na orale dosering hun biologische beschikbaarheid konden vergroten. Om dit te testen combineerden we de orale dosering met BCRP-remmers in mdr1a/1b P-gp-negatieve muizen. Biologische beschikbaarheid wordt gedefinieerd als de totale hoeveelheid medicijn die systemisch beschikbaar is per periode. De test vergelijkt de hoeveelheid
 25 medicijn die systemisch beschikbaar is als die wordt toegediend in de aanwezigheid en in de afwezigheid van een remmer van BCRP. Uiteraard dienen alle variabelen zo identiek als mogelijk gehouden te worden, bijvoorbeeld de hoeveelheid en de vorm waarin het medicijn wordt toegediend. Het meten van de systemische hoeveelheid kan op iedere bekende manier voor lichaamsvloeistoffen geschieden bijvoorbeeld bloed,
 30 serum, plasma of weefsel waardoor systemisch vloeistof gaat zoals huid. Ook kan urine gebruikt worden voor het testen op niet-gemetaboliseerd medicijn.

De verbindingen waarvan op biologische beschikbaarheid getest moet worden werden gekozen uit een serie algemeen bekende cytostatische medicijnen. Voorbeelden

van geteste verbindingen zijn topotecan, GG211, DX8951f, BNP1350, 9-aminocamptothecine, 9-nitrocamptothecine en irinotecan. Dit zijn dus voorbeelden van indolizino-chinoline (in het bijzonder camptothecine) derivaten, chinazolinederivaten bijvoorbeeld prazosine en anthrachinon b.v. mitoxantron. Derhalve is een breed scala

5 aan verbindingen met variërende lipofiliciteit, oplosbaarheid en hydrofobiciteit getest. De groep kan als representatief beschouwd worden voor een groot aantal natuurlijk voorkomende toxinen. De onderhavige uitvinding is echter niet beperkt tot alleen natuurlijk voorkomende toxinen als verbindingen waarvan de biologische beschikbaarheid na orale dosering verhoogd kan worden. In wezen kan de biologische

10 beschikbaarheid na orale dosering van iedere verbinding die onderhavig is aan BCRP-transport verbeterd worden. Voor de deskundige is het relatief gemakkelijk om vast te stellen of een verbinding onderworpen is aan transport gerelateerd aan en/of gestuurd door BCRP. De deskundige kan in een modelsysteem vaststellen of opname van een specifiek te testen verbinding laag is als het modelsysteem bestaat uit een cel of

15 organisme dat BCRP tot overexpressie brengt. Talrijke dergelijke tumorsoorten zijn algemeen bekend bijvoorbeeld borsttumoren (MCF-7/AdrVp), colon carcinoma (S1, HT29), maagcarcinoma's (EPG85-257), fibrosarcoma (EPF86-079) en van myeloma (8226) oorsprong (Proceeding of the American Association for Cancer Research volume 40, maart 1999, e.g., Miyake et al. Abstract 2089 en Ross et al. Abstract 2092),

20 evenals van de tumorcel afgeleide cellijnen zoals T8 en MX3 afgeleid van de humane eierstok-kankercellijn IGROV-1 zoals beschreven door Maliepaard et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research volume 40, maart 1999, Abstract 4416. Daarnaast kan men het medicijn testen in een systeem waarvan bekend is dat het een of meer andere types MDR heeft om vast te stellen of de verbinding alleen aan

25 BCRP gerelateerd transport onderworpen is of aan meerdere vormen van transport. In het laatste geval zal het de voorkeur hebben om ofwel een remmer toe te passen die niet alleen BCRP gerelateerd transport blokkeert maar ook de relevante andere systemen en/of een aantal remmers te doceren die specifiek zijn voor ieder relevant transportsysteem. Anderzijds kan men ook slechts vaststellen of een te testen

30 verbinding, binding aan het BCRP-eiwit vertoont wat indicatief is voor het betrokken zijn van BCRP in het transport daarvan.

Er zijn een aantal BCRP-remmers beschikbaar. Deze verbindingen hebben een variërende specificiteit ten opzichte van BCRP en ook ten opzichte van andere eiwitten

zoals P-gp. De verbinding 9,10-dihydro-5-methoxy-9-oxo-n[4-[2,(1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-2-isochuilonyl)ethyl]-4-acridinecarboxamide werd getest. Het is bekend dat deze verbinding ook aan P-gp gerelateerd transport remt in tumorcellen in vitro die P-gp tot overexpressie brengen. Een andere BCRP-remmer is fumitremorgine C (FTC), wat een mycotoxine is. Andere mycotoxinen kunnen ook toegepast worden als verbeteraars van de biologische beschikbaarheid. FTC is een voorbeeld van een verbinding die geen effect heeft op P-gp gerelateerd transport. Een ander voorbeeld waarvan het bekend is dat het BCRP remt is BIB-F. Een andere verbinding van belang is cyclosporine A. Deze verbindingen, die beschreven zijn in een aantal publicaties die hierbij door verwijzing opgenomen zijn, zijn beschikbaar voor de deskundige. De referenties zijn Schlegel et al. Abstract 4415 Proc. Am. Ass. Cancer Res. Vol 40; maart 1999: 669 en Rabindran et al. Abstract 2093 ibid, pag. 315. Om te voorzien in BCRP-remmers met verschillende specificiteit kunnen derhalve de volgende categorieën verbindingen in ogenschouw worden genomen: acridinederivaten, chinolinederivaten in het bijzonder isochinolinederivaten en combinaties daarvan. Andere remmers kunnen gemakkelijk door de deskundige gevonden worden. Bijvoorbeeld zouden monoklonale antilichamen specifiek tegen BCRP opgewekt een geschikte alternatieve bron voor remmers kunnen zijn. Recombinante klonen die BCRP produceren zouden gebruikt kunnen worden als bron voor eiwit waartegen monoklonale antilichamen opgewekt zouden kunnen worden op een op zich bekende manier voor het opwekken van monoklonale antilichamen tegen recombinant eiwit op een op zich bekende manier voor het produceren van recombinant eiwit. Zoals elders vermeld is de genetische informatie die codeert voor BCRP beschikbaar en dus in de methodologie duidelijk voor de deskundige om dit eiwit tot expressie te brengen.

Monoklonale antilichamen zouden zeer specifieke remmers van BCRP zijn en zijn als zodanig een uitvoeringsvorm die de voorkeur heeft uit de groep toe te passen remmers. Een minder specifieke remmer zou een ATP-ase-remmer kunnen zijn, bij voorkeur een remmer die specifiek is voor BCRP-ATP-ase. Een dergelijke verbinding zou de aan ATP gerelateerde activiteit van het eiwit remmen en derhalve transport voorkomen.

In het bijzonder is de BCRP-remmer bedoeld om de stroom terug uit het bloed of epiteel-lumen te remmen. Zo is de terugkeer van medicijnen geremd uit het cytoplasma van enterocyten terug naar het lumen van de darmen. Als gevolg van het feit dat BCRP

niet alleen aanwezig is in het darmkanaal maar ook elders, kan het BCRP-transport op deze andere plaatsen ook beïnvloed zijn. Echter, het effect zal het grootste zijn in de darmen als gevolg van de orale dosering van de remmer. Bij voorkeur zal de verbeteraar van de biologische beschikbaarheid, dat is de remmer van BCRP, snel aan

5 BCRP binden en remmen terwijl het medicijn door het enterocyt gaat. De remmer kan reversibel of irreversibel zijn. Als ze reversibel is zal de verbeteraar de lever passeren en verwijderd worden. Daarnaast zal de natuurlijke beschermende activiteit van het BCRP-systeem tegen toxinen in het dieet enige tijd na de orale dosering herstellen. De verbeteraar kan als competitieve niet-competitieve, gemengde of irreversibele remmer

10 optreden. Ze kan transporteerbaar of niet-transporteerbaar zijn. Ze kan binden of interactie hebben met het cytoplasmatisch beschikbare oppervlak, met een membraan overspannend domein en met een ATP bindende plaats van het BCRP. Door interactie met BCRP is het mogelijk om de binding van ATP te voorkomen.

Op geschikte wijze kan een verbeteraar van de biologische beschikbaarheid

15 gekozen worden uit verbindingen die gerelateerd zijn aan bekende substraten voor BCRP. Geschikte verbeteraars kunnen derivaten zijn van acridine, chinoline, isochinoline, indolizino-chinoline, camptothecine, anthrachinon, chinazoline, bisantreen en rhodamine. Alternatief kan een verbeteraar gekozen worden uit vinca-alkaloïden, vetzuren, triazolen, taxol en derivaten daarvan, pyrrolidonen, piperazinen,

20 piperidinen, pyridinen, pyridonen, pyrrolidinen, retinoïden, salicylaten, sorbintanen, fenothiazinen, polyethyleenglycolen, colchicine, cephalosporinen, cannabioïden, cyclische peptiden, flavones, flavenoïden, opioïden, fenyalkylaminen, aminoacridinen, aminochinolinen, aniliden, anthracyclinen, antibiotica, anti-estrogenen, imidazolen, (iso)chinolinen, benzofuranen, benzodiazepinen, benzhydryl verbindingen,

25 benzazepinen, dibenzazepinen, epipodofyllotoxinen, macroliden, rauwolfia-alkaloïden, steroïden. Bij voorkeur worden verbindingen toegepast die geen affiniteit voor P-gp vertonen die voldoende is om een toegenomen biologische beschikbaarheid als gevolg van een effect op het P-gp-transportstelsel te brengen. Op geschikte wijze kan een P-gp bindende verbeteraar die ook specificiteit voor BCRP vertoont die voldoende

30 is om de biologische beschikbaarheid van een medicijn dat niet onderworpen is aan transport door het P-gp-mechanisme te vergroten toegepast worden in combinatie met een dergelijk medicijn of bij een celtype dat geen P-gp-systeem heeft.

De te doseren hoeveelheid zal afhangen van het medicijn waarmee het gecombineerd wordt, de soort ziekte die aangepakt wordt, de farmacologische aanvaardbaarheid van de dosering, de afmeting, geslacht en leeftijd van de patiënt etcetera. De deskundige zal van geval tot geval bepalen welke factoren farmacologisch van belang zijn. Er zijn talrijke tests beschikbaar om het beste doseringsregime vast te stellen. Op geschikte wijze dient de maximale toename van de biologische beschikbaarheid bereikt te worden. Derhalve wordt die combinatie van medicijn en remmer bij voorkeur gekozen. Als eenmaal is vastgesteld dat een bepaald medicijn verhoogde biologische beschikbaarheid kan ondergaan, is het vervolgens mogelijk om de dosering te verlagen die oraal toegediend moet worden om het gewenste medicinale effect te bereiken. Derhalve kan de hoeveelheid toe te dienen medicijn gereduceerd worden. Het wordt dus mogelijk om lagere doseringsvormen van bekende medicijnen toe te dienen. Ook wordt het mogelijk om oraal medicijnen toe te dienen die voordien niet oraal werden toegediend als gevolg van extreme bijwerkingen of toxiciteit bij het hoge niveau dat nodig is om redelijke of effectieve serumconcentraties te bereiken. Ook is het zeer waarschijnlijk dat een toename van de biologische beschikbaarheid zal resulteren in een lagere variabiliteit van de beschikbaarheid van oraal toegediende verbindingen, waardoor het mogelijk wordt om anders onbetrouwbare medicatie toe te passen. Op geschikte wijze neemt de biologische beschikbaarheid met ten minste 10% toe. Bij voorkeur wordt zelfs een hogere toename bijvoorbeeld meer dan 20% zelfs meer dan 30% bereikt. Uiteraard is het de bedoeling een zo hoog mogelijke toename te verkrijgen.

Het wordt nu mogelijk om selectief door BCRP gestuurd en/of aan BCRP gerelateerd transport te verbeteren. Dit kan bereikt worden door het kiezen van een remmer die meer affiniteit heeft voor BCRP dan enig ander eiwit dat aan medicijntransport gerelateerd is en aanwezig is in het spijsverteringskanaal of in cellen die behoren bij het orale traject van medicijnen die biologische beschikbaarheid beïnvloeden. Dit kan ook bewerkstelligd worden door het kiezen van een remmer die meer affiniteit heeft voor BCRP dan een bepaald ander eiwit dat aanwezig is in het spijsverteringskanaal of gerelateerd is aan cellen die behoren bij het orale traject van medicijnen die biologische beschikbaarheid beïnvloeden. Specifiek kan men denken aan een verbeteraar dat door BCRP gestuurd of aan BCRP gerelateerd transport beter remt dan ander aan "multidrug" weerstand gerelateerd medicijntransport. In dit verband

is in het bijzonder aan MDR gerelateerd medicijntransporteiwit een kandidaat die de voorkeur heeft. Een dergelijke verbeteraar van de biologische beschikbaarheid is op geschikte wijze beter in het remmen van aan BCRP gerelateerd of door BCRP gestuurd transport dan door P-gp gestuurd of aan P-gp gerelateerd transport. Ook kan men zich

5 indenken dat de specificiteit voor BCRP beter is dan voor MRP en/of MVP. Op geschikte wijze kan ook één of meer combinaties worden beoogd. Ook kan een verbeteraar beoogd worden die alleen door BCRP gestuurd en/of aan BCRP gerelateerd transport remt en niet een van de andere systemen beïnvloedt.

De gekozen remmer zal ook afhangen van de keuze van toe te dienen medicijn.

10 Het is bekend dat sommige medicijnen slechts door een mechanisme getransporteerd worden, sommige door meer dan een en sommige door een veelheid aan systemen. Het is duidelijk dat als meer dan een systeem een rol speelt, ofwel talrijke specifieke remmers of een algemeen toepasbare remmer de voorkeur zullen hebben om maximaal effect te bereiken.

15 De beste manier om de gewenste combinatie vast te stellen is op basis van tests. Het is moeilijk om op basis van molecuulstructuur te voorspellen welke combinatie toe te passen. Het is ook moeilijk om alleen aan de hand van de molecuulstructuur vast te stellen of een medicijn, of een verbeteraar van de biologische beschikbaarheid, specifiek zal zijn voor BCRP, of een breder spectrum aan activiteit zal hebben. Echter,

20 moleculair ontwerpen zou kunnen helpen bij het kiezen van geschikte remmers.

Geschikte biologische tests om naar remmers te zoeken zijn beschreven in US-5.567.592, in verwijzingen daarin geciteerd en in verwijzingen geciteerd in de onderhavige octrooibeschrijving. De toe te passen tests zullen gemakkelijk duidelijk zijn voor de deskundige. Voorbeelden zijn binnenstebuiten gekeerde darmtest, selectie

25 van remmer onder toepassing van celgroeitests, "brush border" membraantests, medicijnopnametests onder toepassing van fluorescente ATP-ase.

De relatieve geschiktheid van verbindingen om als verbeteraars van de biologische beschikbaarheid te dienen kan vastgesteld worden gebruikmakend van in vitro en/of in vivo metingen van medicijntransport. Talrijke systemen zijn beschikbaar

30 die als zodanig dienst kunnen doen of die enige aanpassing vereisen om specifiek voor BCRP te zijn indien gewenst. Dergelijke aanpassingen echter zal de deskundige zich kunnen voorstellen. De activiteit van transport gerelateerd aan of gestuurd door BCRP kan bepaald worden als de hoeveelheid ATP afhankelijk transport in een systeem dat

BCRP omvat en naar keuze vrij is van een of meer andere actieve ATP afhankelijke transportsystemen. Ook kan het bepaald worden als medicijn afhankelijk hydrolyse van ATP. De activiteit kan bepaald worden gebruikmakend van elektrodes of kleurstof, danwel chemisch gevoelig of gevoelig voor voltage. Ook kan men zich talrijke in vivo tests indenken, analoog aan de tests die uitgevoerd worden voor de beoordeling van het MDR-systeem ten aanzien van weerstand en gevoeligheid. Men voorziet het toepassen van een knockout testdier waarin BCRP-gen geïnactiveerd is. Een dergelijk knockout dier is ook onderwerp van de uitvinding.

De biologische beschikbaarheid van het medicijn in de aanwezigheid en in afwezigheid van een remmer van BCRP werd vastgesteld in *mdr 1a/1b* dubbele knockout-muizen. De biologische beschikbaarheidtests kunnen ook uitgevoerd worden met ofwel MRP en/of P-gp knockout-muizen, waardoor bepaald kan worden of enig gevonden effect als gevolg van de aanwezigheid van de remmer het gevolg is van alleen BCRP, en niet van P-gp en/of MRP. Derhalve kan vastgesteld worden of het bepaalde medicijn door een of meerdere transportsystemen getransporteerd wordt. Het getransporteerde medicijn kan voorzien worden van een detecteerbare markering om vast te stellen waar het zich bevindt en om het te kunnen kwantificeren. Sommige medicijnen kunnen in plasma gedetecteerd en gekwantificeerd worden zonder toepassing van een detecteerbare markering. De gebruikte methodologie is analoog aan de beschrijving in het artikel in de *Lancet* dat hierboven genoemd is en is ook beschreven in *Br. J. Cancer* 1997, 76: 1181-1183. Derhalve wordt de methodologie geacht opgenomen te zijn door verwijzing en wordt geacht ter beschikking te staan aan de deskundige.

Wij vonden een zesvoudige toename van de systemische biologische beschikbaarheid van het geteste medicijn als dit samen met een remmer van BCRP in muizen werd gedoseerd.

Naast de eigenlijke toepassing van de combinatie van verbeteraar en farmaceutisch actieve behandeling voor het verhogen van de biologische beschikbaarheid van de farmaceutisch actieve verbinding beslaat de uitvinding eveneens nieuwe farmaceutische samenstellingen. De uitvinding beslaat farmaceutische samenstellingen in een vorm voor orale toediening, waarbij de samenstelling een farmaceutisch actieve verbinding en een verbeteraar van de biologische activiteit omvat waarbij de verbeteraar een remmer van transport gestuurd door of gerelateerd aan

BCRP is. De farmaceutische samenstelling volgens de uitvinding kan de farmaceutisch actieve verbinding in lagere dosering omvatten dan gewoonlijk wordt toegediend wanneer de farmaceutisch actieve verbinding op zichzelf wordt toegediend, dat wil zeggen zonder de remmer van BCRP. Voor de toepassing van het verhogen van de biologische beschikbaarheid hoeven de twee componenten niet noodzakelijkerwijs 5 gezamenlijk toegediend te worden maar dienen zij aanwezig te zijn in het te behandelen wezen gedurende overlappende perioden. Bij voorkeur zijn zij tegelijkertijd in de darm aanwezig. Alle hierboven beschreven combinaties voor de uitvoeringsvormen van de verbeteraar en de farmaceutisch actieve verbinding, te weten het af te leveren medicijn 10 in een combinatie in een farmaceutische samenstelling, horen bij de omvang van de uitvinding. Toepassing van een dergelijke combinatie bij de bereiding van een medicament voor verbeterde orale afgifte van de farmaceutisch actieve verbinding door middel van remming van het door BCRP gestuurde of aan BCRP gerelateerde transportsysteem wordt ook gedekt. Het heeft de voorkeur om een combinatie te 15 presenteren om maximale aanwezigheid van de verbeteraar met de farmaceutische actieve verbinding die afgeleverd moet worden te verzekeren. Het heeft de voorkeur dat de samenstelling zodanig geformuleerd wordt dat de verbeteraar in de darm samen met of iets eerder dan de farmaceutisch actieve verbinding vrijkomt. De farmaceutische samenstelling kan voorts een farmaceutisch aanvaardbare drager omvatten. De 20 samenstelling is bij voorkeur steriel. Voorts is zij bij voorkeur organoleptisch aanvaardbaar. Bestaande farmaceutische samenstellingen die onbedoeld reeds de combinatie van een BCRP-remmer en een farmaceutisch actieve component voor de behandeling van of het voorkomen van een ziekte of pathologische aandoening omvatten worden niet bedoeld onder de farmaceutische samenstelling volgens de 25 uitvinding te vallen. De farmaceutische samenstelling kan een cytostatisch medicijn of ieder niet cytostatisch medicijn zijn. Ieder medicijn dat verbeterde orale biologische beschikbaarheid behoeft kan opgenomen worden. De combinatie van ofwel een remmer specifiek voor BCRP, met een of meer transportremmers, en een farmaceutisch actieve verbinding wordt ook gedekt, of een farmaceutische verbinding specifiek voor BCRP 30 d.w.z. niet gebruikmakend van het P-gp-transportsysteem in combinatie met een remmer van BCRP valt ook binnen de voorkeursuitvoeringsvormen.

Naast hetgeen hierboven dekt de uitvinding ook een werkwijze voor screenen op farmaceutisch actieve verbindingen die getransporteerd worden via het BCRP-

transportsysteem. De uitvinding dekt ook een werkwijze voor screenen op remmers van transport gestuurd door BCRP of gerelateerd aan BCRP. De werkwijzen voor het screenen zijn analoog aan de processen beschreven voor het screenen van aan P-gp gerelateerde remmers en door P-gp gestuurd of aan P-gp gerelateerd transport van medicijnen zoals beschreven in de geciteerde artikelen die elders in de beschrijving door verwijzing zijn opgenomen. Een dergelijke screening-methode behelst het toepassen van cellen die BCRP tot overexpressie brengen om te testen op binding van de remmer en/of om te testen of een farmaceutisch actieve verbinding in een lagere hoeveelheid aanwezig is in een dergelijke cel dan in een overeenkomstige cel met een actief BCRP-transportstelsel. Als dit het geval is dan treedt actief transport door BCRP op. Vervolgens kan het testen met andere systemen het participeren van andere medicijntransportmechanismen voor het bepaalde te testen medicijn elimineren of aantonen. Derhalve wordt voorzien in een extra manier om verscheidene specificiteiten voor verscheidene mechanismen van medicijntransport uit te zoeken.

De uitvinding dekt ook dieren waarin het BCRP-gen geïnactiveerd is, zodanig dat geen meetbaar transport gerelateerd aan of gestuurd door BCRP onderscheiden kan worden. Dit kan bijvoorbeeld in muizen geschieden als een testmodel voor het in vivo testen van de resultaten van geïnactiveerd transport van het BCRP en ook om te testen of het medicijntransport van de farmaceutisch actieve verbinding wel of niet plaatsvindt. De resultaten in wild-type-dieren d.w.z. overeenkomstig met het knockout-dier met uitzondering van het geïnactiveerde BCRP-transportstelsel kunnen vergeleken worden met de resultaten in het knockout-dier om vast te stellen of een verbinding die gerelateerd is aan of gestuurd wordt door BCRP getest is. Verdere details kunnen verkregen worden door het uitvoeren van tests met andere dieren waarin een of meer transportsystemen gerelateerd aan MDR geëlimineerd zijn. Ook is het mogelijk om systemen te gebruiken waarin een of meer van de andere MDR-transportsystemen alleen actief zijn om informatie over specificiteit voor de verscheidene transportsystemen vast te stellen. De deskundige zal systemen uit de stand der techniek die geschikt zijn herkennen. Ook kan uit de gegevens in de stand der techniek een knockout-systeem bewerkstelligd worden bijvoorbeeld door toepassing van genetische modificatie. De genetische informatie voor BCRP van muizen bijvoorbeeld is beschikbaar en dus is de route naar een BCRP-knockout-muis af te leiden. Het toepassen van een dergelijke knockout-muis bij het screenen is een

bijzonder nuttige uitvoering van de uitvinding. Om mogelijke letaliteitproblemen te omzeilen kan bijvoorbeeld het creloxP-systeem gebruikt worden. Hiermee kan weefsel-specifieke of induceerbare inactivering van het doelgen bereikt worden.

De verkregen muizen kunnen toegepast worden bij de analyse van
5 farmacologische effecten in vergelijking met wild-type-muizen. De knockout-dieren kunnen als testmodellen gebruikt worden voor het vaststellen van haalbaarheid, werkzaamheid en veiligheid van remming van transport gerelateerd aan of gestuurd door BCRP.

10 Voorbeeld 1

Cytotoxiciteitstest

Cytotoxiciteit werd bepaald met behulp van de sulforhodamine (SRB) test.

Cellen werden uitgeplaat in platen met 96 putjes, 1500 cellen/putje. Cellen
15 werden gekweekt gedurende 48 uur bij 37°C en 5% CO₂ in afwezigheid van medicijnen. Vervolgens werden medicijnen toegevoegd in een seriële verdunning van ongeveer 1 µM tot ongeveer 0,05 nM, en werden de cellen gedurende nog 5 dagen bij 37°C en 5% CO₂ gekweekt. Vervolgens werden de cellen gefixeerd in de plaat, gewassen, gekleurd met SRB. Na 20 min werd ongebonden SRB weggewassen met
20 0,1 M azijnzuur. SRB dat is gebonden aan de cellen werd opgelost in 10 mM Tris-HCl-buffer. De absorptie bij 540 nm werd gemeten met een 96-putjes plaatlezer. Voor ieder medicijn werd de IC₅₀-waarde bepaald. Resultaten zijn het gemiddelde van ten minste 3 experimenten. De resultaten zijn weergegeven in de volgende tabel.

Uit deze resultaten wordt duidelijk dat onder normale omstandigheden de T8
25 cellijn verminderd gevoelig is voor topoisomerase I medicijnen, de IC₅₀-waarde voor T8 zijn hoger dan voor IGROV1. De resistentiefactor (Rf), dat is de IC₅₀ voor T8 gedeeld door IC₅₀-waarde voor IGROV1, varieert van 11 voor BNP 1350 tot 231 voor SN-38.

Wanneer de cytotoxiciteit bepaald wordt in aanwezigheid van 2 µM van de
30 BCRP-remmer GG918, vertonen de IC₅₀-waarde voor de T8 resistente cellijn een sterke daling. De cellen worden gevoeliger voor de medicijnen met een factor 1,4 tot 24,4. Het is belangrijk om op te merken dat GG918 geen of nauwelijks effect heeft op

de gevoeligheid van de parentale IGROV1-cel lijn, dus kan effect in T8 worden toegeschreven aan een remming van BCRP door GG918.

- De Rf-waarden in aanwezigheid van GG918 zijn gemiddeld een factor 5 lager vergeleken met de waarden in de afwezigheid van GG918. Door het toevoegen van GG918 is de weerstand van T8 voor topoisomerase I medicijnen grotendeels opgeheven.

Tabel: Cytotoxiciteit topoisomerase I medicijnen in IGROV1 parentale en T8 resistente cellen +/- 2 μ M GG918

	IGROV1 IC ₅₀ (nM)		IGROV1 + GG918 IC ₅₀ (nM)		verhouding -/+ GG918
topotecan	8.93		9.23		0.97
CPT11	543.77		651.02		0.84
SN-38	1.82		1.10		1.66
GG211	0.64		0.87		0.74
DX8951f	0.10		0.17		0.60
BNP1350	0.44		0.84		0.53
	T8 IC ₅₀ (nM)	Rf	T8 + GG918 IC ₅₀ (nM)	Rf	verhouding -/+ GG918
topotecan	978.52	110	40.16	4.3	24.4
CPT11	33958.77	62	3037.67	4.7	11.2
SN-38	419.21	231	6.54	6.0	64.1
GG211	22.44	35	4.57	5.3	4.9
DX8951f	2.88	29	0.39	2.3	7.4
BNP1350	4.94	11	3.45	4.1	1.4

10

Voorbeeld 2

Bepaling van het effect van GG918 (GF120918) op de orale biologische beschikbaarheid van topotecan.

15 *Opzet*

Om effecten van P-glycoproteïneremming door GG918 uit te sluiten, werden mdr 1a/1b (-/-) muizen gebruikt in dit experiment. Eerst werd de muizen oraal GG918 (50 mg/kg) of een controleverbinding toegediend, 15 min voor de toediening van topotecan. Vervolgens werd topotecan oraal toegediend in een dosis van 1 mg/kg. Tot

slot werd bloed verzameld op de aangegeven tijdstippen. Ieder tijdstip representeert drie muizen.

Dieren

- 5 Dieren werden gehuisvest en behandeld volgens de institutionele richtlijnen in naleving van Nederlandse wetgeving. In alle experimenten waren de gebruikte dieren *mdr 1a/1b* (-/-) of wild-type-muizen met een 99% FVB genetische achtergrond, en tussen 9-14 weken oud. Alle dieren konden vrij beschikken of standaard voer (AM-II, Hope Farms; Woerden, Nederland) en aangezuurd water bij een 12h/12h licht/donker
- 10 cyclus en constante kamertemperatuur van 22°C.

Bereiding van medicijnen, toediening en analyse

- GG918 werd gesuspenderd in een formulering voor orale toediening van hydroxypropylcellulose (10 g/l) : Tween 80 (2% v/v): H₂O (0,5 : 1 : 98,5 v/v/v) in
- 15 5 mg/ml. Dieren werden behandeld met 50 mg/kg GG 918 of een overeenkomstige hoeveelheid controleverbinding door toediening in de maag in een volume van 10 µl medicijnoplossing per gram lichaamsgewicht onder lichte metofaan (Mallinckrodt Veterinary, Mundelein, IL, USA) anesthesie. Topotecan (vers bereid, in 5% D-glucose) werd oraal toegediend zodanig dat 5 µl van de geschikte oplossing per gram
- 20 lichaamsgewicht werd toegediend. De dosering was 1,0 mg/kg lichaamsgewicht. Dieren werden opgeofferd op de aangegeven tijdstippen door cardiale punctuur of axillaire bloeding na anesthesie met metofaan en op hetzelfde moment werd bloed verzameld. Gehepariniseerd plasma werd gemengd met 3 volumes koude methanol (-20°C) Topotecan-niveaus in plasma werden bepaald door middel van HPLC-analyse
- 25 zoals beschreven door Rosing et al. (1995) J. Chromatography, 668: 107-115, en zijn weergegeven in de figuur.

Preliminaire conclusie

- Tegelijkertijd toedienen van een enkele orale dosis GG918 resulteert in een sterk
- 30 toegenomen systemische blootstelling aan oraal topotecan. Het oppervlak onder de curve (AUC) is ongeveer zesvoudig toegenomen (zie figuur).

Conclusies

1. Werkwijze voor het verhogen van de biologische beschikbaarheid van een
oraal toegediend farmaceutische verbinding door het toedienen van de verbinding
5 samen met een verbeteraar van de biologische beschikbaarheid die een remmer van
door BCRP gestuurd en/of aan BCRP gerelateerd transport van medicijnen omvat.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, **gekenmerkt**, doordat de biologische
beschikbaarheid met ten minste 10%, bij voorkeur met ten minste 20% en met meer
10 voorkeur met ten minste 30% verbeterd wordt.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, **gekenmerkt**, doordat de verbeteraar van
de biologische beschikbaarheid een selectieve remmer van door BCRP gestuurd en/of
aan BCRP gerelateerd medicijntransport is.

15

4. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-3, **gekenmerkt**, doordat de
verbeteraar van de biologische beschikbaarheid een acridinederivaat, een
chinolinederivaat in het bijzonder een isochinolinederivaat of combinaties daarvan is.

20 5. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-4, **gekenmerkt**, doordat de
verbeteraar van de biologische beschikbaarheid GG918 is.

6. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-4, **gekenmerkt**, doordat de
verbeteraar van de biologische beschikbaarheid een mycotoxine is, zoals
25 fumitremorgine C.

7. Werkwijze volgens een van de voorgaande conclusies, **gekenmerkt**, doordat
de verbeteraar van de biologische beschikbaarheid door BCRP gestuurd en/of aan
BCRP gerelateerd transport beter remt dan andere aan MDR gerelateerde eiwitten
30 gestuurd en/of gerelateerd transport.

8. Werkwijze volgens een van de voorgaande conclusies, **gekenmerkt**, doordat
de verbeteraar van de biologische beschikbaarheid door BCRP gestuurd en/of aan

BCRP gerelateerd transport beter remt dan door P-gp gestuurd en/of aan P-gp gerelateerd transport.

- 5 9. Werkwijze volgens een van de voorgaande conclusies, **gekenmerkt**, doordat de verbeteraar van biologische beschikbaarheid door BCRP gestuurd en/of aan BCRP gerelateerd transport beter remt dan door MRP gestuurd en/of aan MRP gerelateerd transport.

- 10 10. Werkwijze volgens een van de voorgaande conclusies, **gekenmerkt**, doordat de verbeteraar van de biologische beschikbaarheid door BCRP gestuurd en/of aan BCRP gerelateerd transport remt zonder ander aan MDR gerelateerd eiwit gestuurd en/of gerelateerd transport te beïnvloeden.

- 15 11. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-3 of 6-10, **gekenmerkt**, doordat de verbeteraar van de biologische beschikbaarheid door BCRP gestuurd en/of aan BCRP gerelateerd transport remt zonder door P-gp gestuurd en/of aan P-gp gerelateerd transport te beïnvloeden.

- 20 12. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-3 of 6-10, **gekenmerkt**, doordat de verbeteraar van de biologische beschikbaarheid door BCRP gestuurd en/of aan BCRP gerelateerd transport remt zonder door MRP gestuurd en/of aan MRP gerelateerd transport te beïnvloeden.

- 25 13. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-3 of 6-12, **gekenmerkt**, doordat de verbeteraar van de biologische beschikbaarheid alleen door BCRP gestuurd en/of aan BCRP gerelateerd transport remt.

- 30 14. Werkwijze volgens een van de voorgaande conclusies, **gekenmerkt**, doordat de verbeteraar van de biologische beschikbaarheid interactie heeft met BCRP.

15. Werkwijze volgens een van de voorgaande conclusies **gekenmerkt**, doordat de verbeteraar van de biologische beschikbaarheid het binden van ATP, bij voorkeur aan BCRP, voorkomt.

16. Werkwijze volgens een van de voorgaande conclusies, **gekenmerkt**, doordat de farmaceutisch actieve verbinding onderworpen is aan door BCRP gestuurd en/of aan BCRP gerelateerd transport.

5

17. Werkwijze volgens een van de voorgaande conclusies, **gekenmerkt**, doordat de farmaceutisch actieve verbinding een indolizino-chinolinederivaat is.

18. Werkwijze volgens conclusie 17, **gekenmerkt**, doordat de farmaceutisch
10 actieve verbinding een derivaat van camptothecine is.

19. Werkwijze volgens conclusie 18, **gekenmerkt**, doordat de farmaceutisch actieve verbinding topotecan, GG211, DX8951f, BNP1350, 9-aminocamptothecine, 9-nitrocamptothecine of CPT11, of elk metaboliet daarvan, zoals SN38, is.

15

20. Werkwijze volgens conclusie 1-16, **gekenmerkt**, doordat de farmaceutisch actieve verbinding een derivaat van anthrachinon is.

21. Werkwijze volgens conclusie 20, **gekenmerkt**, doordat de farmaceutische
20 actieve verbinding mitoxantron is.

22. Werkwijze volgens conclusies 1-16, **gekenmerkt**, doordat de farmaceutische actieve verbinding een derivaat van chinazoline is.

23. Werkwijze volgens conclusie 22, **gekenmerkt**, doordat de farmaceutische
25 actieve verbinding prazosine is.

24. Farmaceutische samenstelling omvattende een verbeteraar van de biologische beschikbaarheid en een farmaceutisch actieve verbinding waarbij de verbeteraar en de
30 farmaceutisch actieve verbinding gekozen zijn volgens een van voorgaande conclusies, waarbij de farmaceutisch samenstelling verbeterde biologische beschikbaarheid vertoont in vergelijking met overeenkomstige farmaceutische samenstelling waarin de verbeteraar absent is.

25. Toepassing van een farmaceutisch actieve verbinding in combinatie met een verbeteraar van de biologische beschikbaarheid zoals gedefinieerd in een van de voorgaande conclusies als actieve bestanddelen bij de bereiding van een farmaceutische samenstelling voor de orale afgifte van een farmaceutisch actieve verbinding, waarbij
5 de farmaceutische samenstelling verbeterde biologische beschikbaarheid vertoont in vergelijking met een overeenkomstig farmaceutisch samenstelling waarin de verbeteraar absent is.

10 26. Toepassing van een farmaceutisch actieve verbinding in combinatie met een verbeteraar van de biologische beschikbaarheid zoals gedefinieerd in een van de conclusies 1-24, als actieve bestanddelen bij de bereiding van een farmaceutische samenstelling voor de orale afgifte van een farmaceutisch actieve verbinding, waarbij de farmaceutische samenstelling verbeterde biologische beschikbaarheid vertoont voor
15 het opheffen van de weerstand tegen medicijnen in humane en dierlijke aandoeningen die gerelateerd zijn aan de overexpressie van BCRP.

27. Monoklonaal antilichaam dat specifiek is voor BCRP, bij voorkeur een humaan anti-BCRP-antilichaam.

20

28. Dier dat inactief BCRP heeft en/of vrij is van BCRP bijvoorbeeld een dier dat een genetisch gemodificeerd BCRP-knockout-dier is.

29. Werkwijze voor het screenen op een verbinding die geschikt is voor het
25 verbeteren van de biologische beschikbaarheid van een oraal toegediend medicijn in een zoogdier, waarbij het medicijn getransporteerd wordt door aan BCRP gerelateerd of door BCRP gestuurd medicijntransportsysteem door testen op een verbinding die kandidaat is om transport door BCRP te remmen en een verbinding te selecteren die dergelijke remming vertoont, in het bijzonder die dergelijke remming in de darmen of
30 het spijsverteringskanaal vertoont.

30. Toepassing van een verbinding geselecteerd volgens conclusie 29, als verbeteraar van biologische beschikbaarheid in een farmaceutische samenstelling volgens conclusie 24.

- 5 31. Toepassing van een monoklonaal antilichaam volgens conclusie 27 als verbeteraar van de biologische beschikbaarheid in een farmaceutische samenstelling volgens conclusie 24.

- 10 32. Toepassing van een dier volgens conclusie 28, voor het screenen op een verbinding die nuttig is voor het verbeteren van de biologische beschikbaarheid van een oraal toegediend medicijn in een zoogdier, waarbij het medicijn getransporteerd wordt door aan BCRP gerelateerd of door BCRP gestuurd medicijntransportsysteem door het testen op een verbinding die kandidaat is voor remming van transport door BCRP en het selecteren van een verbinding die dergelijke remming vertoont, in het bijzonder die
15 dergelijke remming in de darm of het spijsverteringskanaal vertoont.

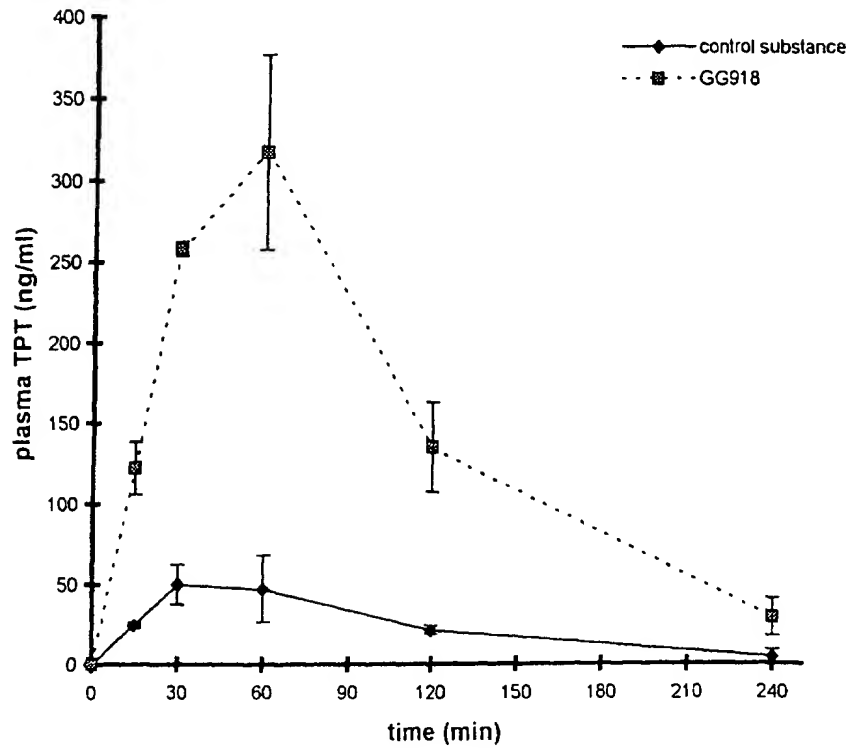
XXXXXXXX

1012481

FIGURE

Oral availability Topotecan

plasma levels after 1 mg/kg oral TPT in *mdr1a/1b* (-/-) mice with or without 50 mg/kg GG918 (at T=-15min), n=3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.